製品コード 6658 ～ 6663

研究用

TaKaRa

AAVpro® Helper Free System
(AAV-U6-ZsGreen1) (AAV-2xU6)

説明書

v201508Da

本製品の使用について

本製品をご利用の際は、以下の点にご注意ください。

- 本製品の使用には文部科学省の定める省令（「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号）にある P1 レベル以上の施設が必要です。
- 本製品ご利用の際は省令および組織内の組換え DNA 実験安全委員会の指示に従い、安全には十分ご注意ください。
- 本アデノ随伴ウイルスベクターの系によって生産されるウイルスは挿入断片によっては危険なウイルスを含む恐れがあるため、組換えアデノ随伴ウイルスベクターの生産と取扱いには、適切な処置をとる必要があります。吸入や付着を防ぐため、必ず、安全キャビネットを使用してください。
- 本製品の使用には遺伝子工学と細胞培養に関する基本的な技術が必要です。

I. はじめに

I-1. アデノ随伴ウイルスベクター

アデノ随伴ウイルス (Adeno Associated Virus: AAV) は、アデノウイルスやヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在下で増殖するパルボウイルス科ディペンドウイルス属に属する非エンベロープウイルスです。AAV はヒトへの病原性が知られておらず、物理化学的に極めて安定であることが知られています。AAV のゲノムは約 4.7 kb の 1 本鎖 DNA で、両末端に ITR (Inverted Terminal Repeat) と呼ばれる T 字型のヘアピン構造が存在します（図 1）。この ITR が複製の開始点となり、プライマーとして機能するほかウイルス粒子へのパッケージングにも寄与します。AAV のゲノムには 3 つの ORF がコードされており、1 つ目は複製、転写に関連している Rep、2 つ目はウイルス粒子の外殻タンパク質をコードする Cap、3 つ目は非構造タンパク質であり、ウイルス粒子形成に必須の因子である AAP です。Rep 領域には 4 種類の異なるタンパク質（Rep78、Rep68、Rep52、Rep40）がコードされており、また Cap 領域には 3 種類の異なるタンパク質（VP1、VP2、VP3）がコードされています。
AAV には 100 を超える血清型が存在しており、血清型の違いによって宿主域やウイルスの持つ特徴が異なることが知られています。タカラバイオでは血清型 2、5、6 のアデノ随伴ウィルスベクター調製システムを発売しています。血清型 2（AAV2）は古くから広く研究されてきた血清型の 1 つであり、宿主域が大変広いことが知られています。血清型 5（AAV5）と血清型 6（AAV6）は、より高い組織指向性を持った血清型です。AAV5 は中枢神経系、肝臓、網膜等、AAV6 は心臓、筋肉、肝臓等への遺伝子導入効率が高いと言われています。詳細に関しては、XIII. 参考文献やタカラバイオウェブサイトの「アデノ随伴ウイルス AAV による遺伝子導入」のページをご参照ください。

アデノ随伴ウイルスベクター（AAV ベクター）は、上記のような AAV の特長を利用した、培養細胞や動物個体への遺伝子導入用ベクターであり、研究用ツールのみならず遺伝子治療用ベクターとしても使用実績のあるウイルスベクターです。また、AAV ベクターは文部科学省の定める省令（「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号）にある P1 レベルの施設で取扱いが可能であり、アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターと比較して、安全で取扱いの容易なウイルスベクターとして知られています。AAV ベクターは、増殖／非増殖のいずれの細胞にも遺伝子導入が可能であり、特に非分裂細胞においては長期間の発現が可能です。また、免疫原性が低く、動物個体への遺伝子導入（*in vivo* transduction ツール）にも適しています。

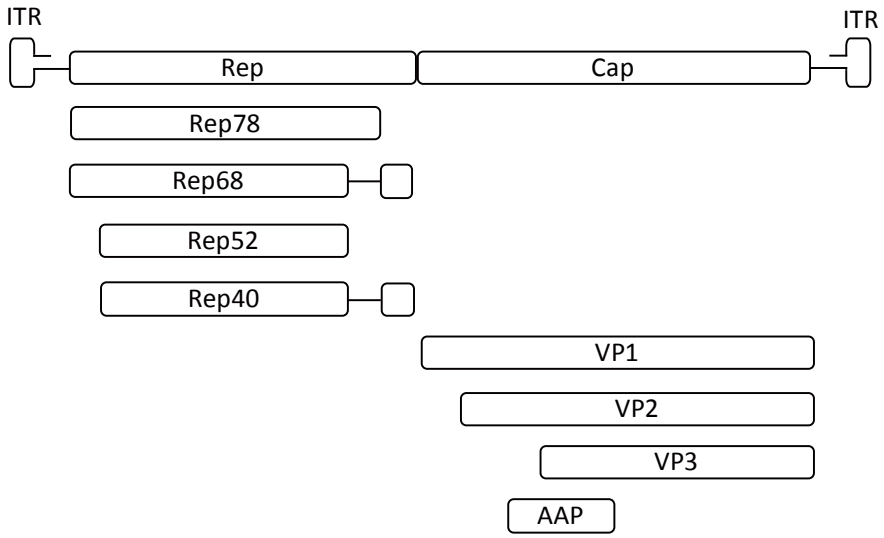


図 1. 野生型 AAV ゲノム構造とコードするタンパク質

I-2. 製品説明、原理

遺伝子発現を抑制するひとつの手法として RNA 干渉作用（RNA interference；RNAi）があります。RNAi は二本鎖 RNA を導入することにより、標的遺伝子の mRNA を分解し、発現を抑制する手法で、哺乳類細胞では 21 ～ 23 塩基の短い二本鎖 RNA（short interfering RNA；siRNA）によって RNAi 効果が得られることが明らかとなっています。RNAi 実験の主な手法としては、合成 siRNA を導入する方法と、発現ベクターを用いて細胞内で siRNA を形成させる方法が挙げられます。合成 siRNA ではその RNAi 効果は一過性ですが、発現ベクターを用いることで RNAi 効果の持続が期待できます。

AAVpro Helper Free System (AAV-U6-ZsGreen1)、AAVpro Helper Free System (AAV-2xU6) は、RNA polymerase III（pol III）系のプロモーターを搭載した血清型 2、5 または 6 の AAV ベクターをヘルパーウイルスを使用せずに安全に作製するためのキットです（AAV Helper Free System）。本製品を使用して作製した AAV ベクターを用いることにより、標的細胞や標的動物個体においてヘアピン型 RNA（shRNA）を一過性に発現させることができます。なお、動物個体において使用する場合は、精製した AAV ベクターの使用を推奨します＊1。

＊ 1：血清型 2 の AAV ベクターを用いる際は、AAVpro Purification Kit (AAV2)（製品コード 6232）を用いて AAV ベクターの精製を行うことができます。

製品の特長

A. AAV Helper Free System による AAV ベクターの作製

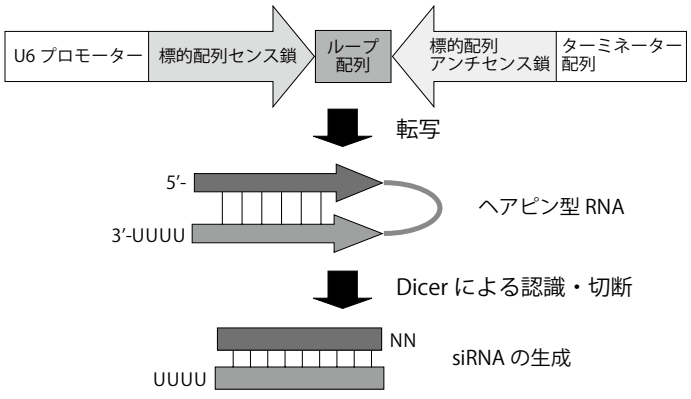
AAV Helper Free System はヘルパーウイルスを使用せずに高タイターな AAV ベクターを作製する独自のシステムです（図 2）。本製品では、AAV ベクターの作製に必要な複数のプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションすることで、簡便に AAV ベクターを作製することができます。ここで必要なコンポーネントは、以下の 3 種類のプラスミドです。

AAVpro Helper Free System シリーズでは、ベクタープラスミド骨格や血清型の異なる 6 種類の shRNA 発現用のキットを取り揃えています。標的細胞／組織、実験目的に応じて選択してください。

・pAAV Vector： 目的 shRNA の発現カセットと 2 つの ITR を含むベクタープラスミド

pAAV-U6-ZsGreen1 Vector（製品コード 6658、6659、6660）
1 種類の shRNA 発現用ベクター。mU6 プロモーターより shRNA を発現させ、CMV プロモーターより緑色蛍光タンパク質 ZsGreen1 を発現させる。ZsGreen1 の発現により導入の確認や導入細胞だけでの評価が可能である。

pAAV-2xU6 Vector（製品コード 6661、6662、6663）
2 種類の shRNA 発現用ベクター。2 種類の shRNA をそれぞれ hU6 プロモーターと mU6 プロモーターから発現させる。2 つの遺伝子の同時ノックダウンや 1 つの遺伝子に対して 2 種類の shRNA を作用させることによるノックダウン効果の増強に利用できる。



・pRC Vector： AAV2 の Rep 遺伝子および各血清型の Cap 遺伝子を含むプラスミド

pRC2-mi342 Vector＊2：	血清型 2（製品コード 6658、6661）
pRC5 Vector：	血清型 5（製品コード 6659、6662）
pRC6 Vector：	血清型 6（製品コード 6660、6663）

・pHelper Vector： アデノウイルス由来の E2A、E4、VA を含むプラスミド

＊2：AAV2 用の pRC Vector（pRC2-mi342 Vector）には、miRNA の一種である hsa-miR-342 発現カセットが含まれます。この hsa-miR342 は、AAV2 ベクター作製系でタイター向上効果のある miRNA として、miRNA ライブラリーからスクリーニングされた因子です。一般的な Rep および Cap のみを発現する pRC2 Vector 使用時と比較して約 2 倍のタイター向上効果があります（特許出願中：X. 参考データ 1 参照）。

B. AAV Extraction Solution を用いた AAV ベクター抽出法

従来、AAV ベクター産生細胞からのベクター調製は、凍結融解法や超音波破砕法が用いられていました。これらの方法を実施するには、液体窒素や超音波破砕機をあらかじめ用意する必要がありました。本製品には、当社が独自に開発した AAV Extraction Solution が添付されています。この溶液を使用することで、宿主由来のタンパク質や核酸の混入を抑え、簡便に AAV ベクターを抽出することができます（特許出願中）。

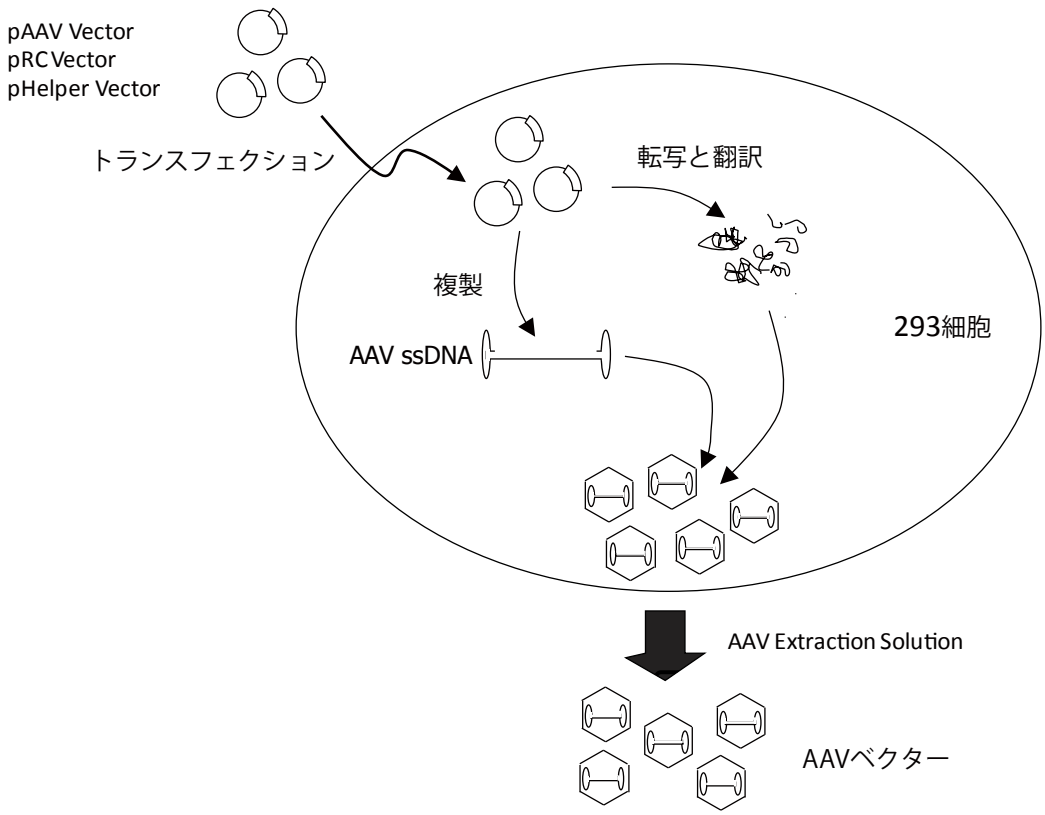


図 2. AAVpro Helper Free System による AAV ベクターの作製

II. キットの内容とプラスミドマップ

II-1. キットの内容

各製品には 3 種類のプラスミドと AAV ベクター産生細胞からのベクター抽出に必要な 2 種類の試薬が含まれています。

[血清型 2]

AAVpro Helper Free System (AAV2-U6-ZsGreen1)（製品コード 6658）

1.	pAAV-U6-ZsGreen1 Vector (1 μg/μl)	20 μl
2.	pRC2-mi342 Vector (1 μg/μl)	20 μl
3.	pHelper Vector (1 μg/μl)	20 μl
4.	AAV Extraction Solution A	1.5 ml × 3 本
5.	AAV Extraction Solution B	150 μl × 3 本

AAVpro Helper Free System (AAV2-2xU6)（製品コード 6661）

1.	pAAV-2xU6 Vector (1 μg/μl)	20 μl
2.	pRC2-mi342 Vector (1 μg/μl)	20 μl
3.	pHelper Vector (1 μg/μl)	20 μl
4.	AAV Extraction Solution A	1.5 ml × 3 本
5.	AAV Extraction Solution B	150 μl × 3 本

[血清型 5]

AAVpro Helper Free System (AAV5-U6-ZsGreen1)（製品コード 6659）

1.	pAAV-U6-ZsGreen1 Vector (1 μg/μl)	20 μl
2.	pRC5 Vector (1 μg/μl)	20 μl
3.	pHelper Vector (1 μg/μl)	20 μl
4.	AAV Extraction Solution A	1.5 ml × 3 本
5.	AAV Extraction Solution B	150 μl × 3 本

AAVpro Helper Free System (AAV5-2xU6)（製品コード 6662）

1.	pAAV-2xU6 Vector (1 μg/μl)	20 μl
2.	pRC5 Vector (1 μg/μl)	20 μl
3.	pHelper Vector (1 μg/μl)	20 μl
4.	AAV Extraction Solution A	1.5 ml × 3 本
5.	AAV Extraction Solution B	150 μl × 3 本

[血清型 6]

AAVpro Helper Free System (AAV6-U6-ZsGreen1)（製品コード 6660）

1.	pAAV-U6-ZsGreen1 Vector (1 μg/μl)	20 μl
2.	pRC6 Vector (1 μg/μl)	20 μl
3.	pHelper Vector (1 μg/μl)	20 μl
4.	AAV Extraction Solution A	1.5 ml × 3 本
5.	AAV Extraction Solution B	150 μl × 3 本

AAVpro Helper Free System (AAV6-2xU6)（製品コード 6663）

1.	pAAV-2xU6 Vector (1 μg/μl)	20 μl
2.	pRC6 Vector (1 μg/μl)	20 μl
3.	pHelper Vector (1 μg/μl)	20 μl
4.	AAV Extraction Solution A	1.5 ml × 3 本
5.	AAV Extraction Solution B	150 μl × 3 本

Ready-to-use で使用できる高容量のトランスフェクション用プラスミド（コンポーネント 2 と 3 をセット）を別売り製品として用意しています。

AAVpro Packaging Plasmid (AAV2)（製品コード 6234）
【内容】
・pRC2-mi342 Vector (1 μg/μl)　0.5 ml × 2
・pHelper Vector (1 μg/μl)　0.5 ml × 2

AAVpro Packaging Plasmid (AAV5)（製品コード 6664）
【内容】
・pRC5 Vector (1 μg/μl)　0.5 ml × 2
・pHelper Vector (1 μg/μl)　0.5 ml × 2

AAVpro Packaging Plasmid (AAV6)（製品コード 6665）
【内容】
・pRC6 Vector (1 μg/μl)　0.5 ml × 2
・pHelper Vector (1 μg/μl)　0.5 ml × 2

II-2. プラスミドマップ

各プラスミドの配列情報は、タカラバイオウェブカタログからダウンロードできます。

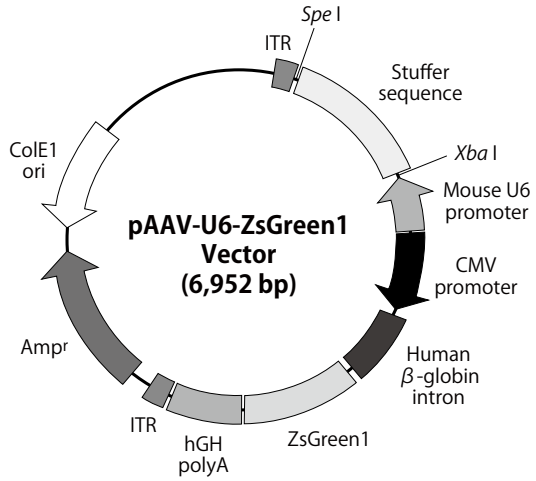


図 3. pAAV-U6-ZsGreen1 Vector プラスミドマップ

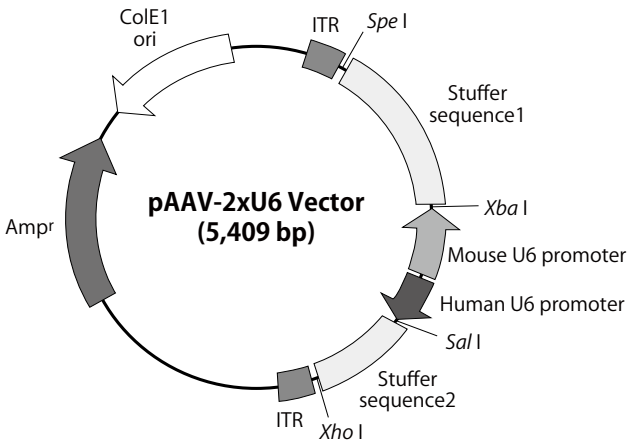


図 4. pAAV-2xU6 Vector プラスミドマップ

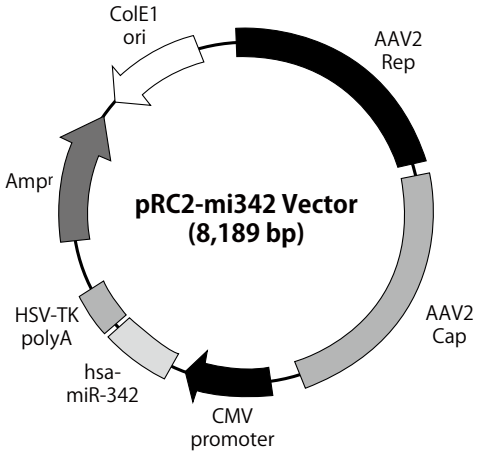


図 5. pRC2-mi342 Vector プラスミドマップ

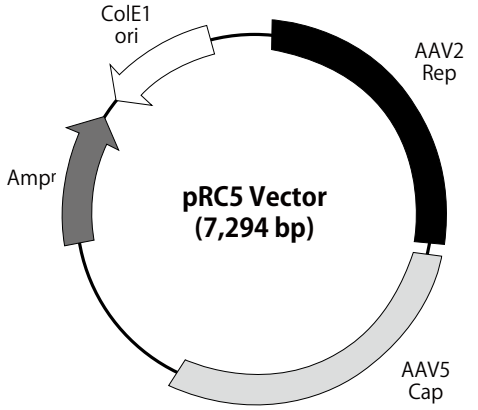


図 6. pRC5 Vector プラスミドマップ

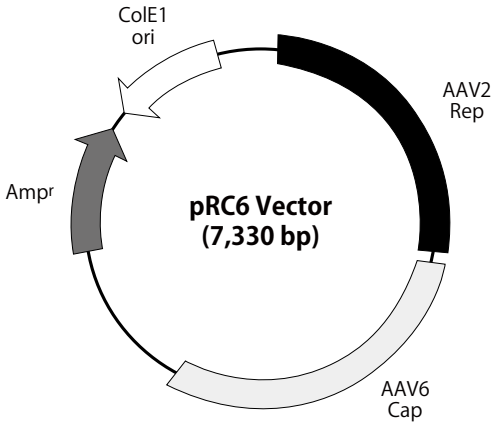


図 7. pRC6 Vector プラスミドマップ

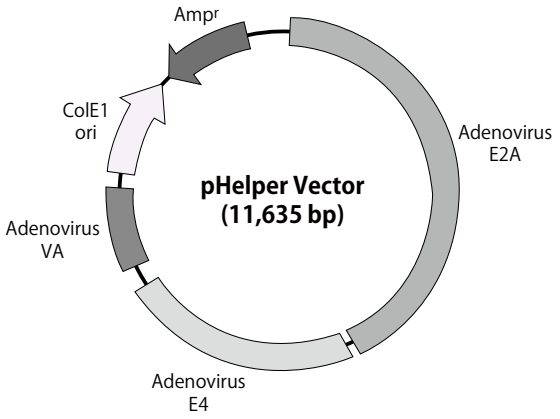


図 8. pHelper Vector プラスミドマップ

III. 保存

−20℃
ただし、AAV Extraction Solution A および AAV Extraction Solution B は融解後、室温保存。
（適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。）

IV. ヘアピン型 RNA を発現させるための DNA 合成

本キットではヘアピン型 RNA を発現させるための合成オリゴ DNA のクローニングに、In-Fusion® HD Cloning Kit（製品コード 639648 など）の使用を推奨します。
ヘアピン型 RNA を発現させるためには、［連結用の配列（15 塩基）−標的配列（センス）−ループ配列−標的配列（アンチセンス）−ターミネーター配列−連結用の配列（15 塩基）］の順でデザインした合成 DNA を用意し、In-Fusion 反応でプロモーターの下流に挿入します。
挿入のために、次ページに示すような合成オリゴ DNA を作製してください（Top strand と Bottom strand の 2 本；N 部分が標的配列）。pol III 系プロモーターの転写開始点はプリン塩基（G または A）が好ましいため、標的配列が G または A で始まらない場合は標的配列の前に G または A を挿入してください。
Xba I-*Spe* I サイトには shRNA oligo DNA-1 を、*Sal* I-*Xho* I サイトには shRNA oligo DNA-2 を挿入します。

ここではループ配列の例として CTGTGAAGCCACAGATGGG（Boden *et al.*[7]）を挙げていますが、GTGTGCTGTCC（Miyagishi *et al.*[8]）も有用であることが確認されています。これ以外のヘアピンループとして、Lee *et al.*[9]、Paddison *et al.*[10]、Paul *et al.*[11]、Sui *et al.*[12] らによってそれぞれ異なった配列が報告されています。1 つのベクターに 2 つの shRNA 発現ユニットを搭載する場合には、ベクター内での組換えのリスクを軽減する目的で 2 つの shRNA に別々のループを使用することを推奨します。
ターミネーター配列には TTTTTT 配列を用います（T が 4 つ続くと pol III 系プロモーターによる転写が止まります）。siRNA 配列と用いるヘアピンループ配列の組み合わせによっては T が 4 つ以上続く可能性があるため、合成 DNA をデザインした後には必ず、Top strand に T が 4 つ以上続いていないことを確認することが必要です。

注：クローニングの手順については 12 ページの VII. 実験操作をご確認ください。

In-Fusion 反応用　合成 DNA 配列

shRNA oligo DNA-1（*Xba* I-*Spe* I サイト）
＜連結用配列 - 標的配列（センス）－ループ配列－標的配列（アンチセンス）－ターミネーター配列 - 連結用配列＞

	連結用配列	転写開始点＊ ↓	target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator	連結用配列
Top strand	5′-GAGAAAAGCCTCTAG	(G/A)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	(C/T) TTTTTT	CTAGTGATATCGATA-3′
Bottom strand	3′-CTCTTTTCGGAGATC	(C/T)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	(G/A) AAAAAA	GATCACTATAGCTAT-5′

shRNA oligo DNA-2（*Sal* I-*Xho* I サイト）
＜連結用配列 - 標的配列（センス）－ループ配列－標的配列（アンチセンス）－ターミネーター配列 - 連結用配列＞

	連結用配列	転写開始点＊ ↓	target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator	連結用配列
Top strand	5′-GAAAGGACGAGTCGA	(G/A)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	(C/T) TTTTTT	TCGAGAGATCTAGGA-3′
Bottom strand	3′-CTTTCCTGCTCAGCT	(C/T)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	(G/A) AAAAAA	AGCTCTCTAGATCCT-5′

＊：ターゲット配列の最初の塩基が G または A でない場合はターゲット配列の前に G または A を挿入すること。

[シーケンス用プライマー]

shRNA oligo DNA-1 配列確認用プライマー　5′-AAGCTTGAATTCGATCCGACG-3′

shRNA oligo DNA-2 配列確認用プライマー　5′-GAATTCAAGCTTAAGGTCGGG-3′

※ ベクター上の Stuffer sequence を挟む制限酵素サイトを利用して、ライゲーションにより合成オリゴ DNA をクローニングすることも可能です。
その場合の合成オリゴ DNA のデザイン等は 16 ページの参考 2 を参照してください。

V. キット以外に必要な器具、試薬類（主なもの）

V-1. 器具・装置

- 100 mm φ細胞培養用表面処理ディッシュ
- 細胞培養に必要な一般的設備

V-2. 試薬類

- In-Fusion HD Cloning Kit（製品コード 639648 など）
- 下記のうちいずれかのトランスフェクション試薬
  a. CalPhos™ Mammalian Transfection Kit（製品コード 631312）
  b. *Trans*IT-293 Transfection Reagent（製品コード MIR2704）
  c. Xfect™ Transfection Reagent（製品コード 631317）
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 4.5 g/L Glucose with L-Glutamine (584 mg/L)
- Fatal Bovine Serum (FBS)
- Trypsin EDTA
- HEK293 もしくは HEK293T 細胞＊1
- 0.5 M EDTA (pH8.0)（EDTA Buffer Powder, pH8.0（製品コード T9191））
- pAAV-ZsGreen1 Vector＊2（製品コード 6231：ポジティブコントロール用）
- 二本鎖オリゴ DNA 調製用バッファー（10 mM Tris-HCl (pH8.0)、50 mM NaCl）＊3

＊1： HEK293 もしくは HEK293T 細胞にはいくつかの系統が知られています。弊社の検討において、一般的に使用されている細胞株では AAV ベクターの産生量が非常に少ない場合が多いことを確認しています。また、Lenti-X™ 293T Cell Line（製品コード 632180)、もしくは HEK293T/17（ATCC CRL 11268）を使用することで AAV ベクター産生が安定して行えることも確認しており、AAV ベクター産生にはこれらの細胞の使用をお勧めします。
なお、作製した AAV ベクターは力価を確認後にご使用ください。

＊2： pAAV-ZsGreen1 Vector は緑色蛍光タンパク質である ZsGreen1 を発現する AAV ベクタープラスミドであり、トランスフェクション効率の確認や、調製した AAV の生物学的力価を確認するためのポジティブコントロールとして使用するのに便利です。（製品コード 6661、6662、6663 使用の場合）

＊3： 二本鎖オリゴ DNA 調製用バッファーには、一般的な 1 × PCR バッファー等も使用可能です（*TaKaRa Ex Taq*®（製品コード RR001A）添付の 10 × *Ex Taq* Buffer（20 mM Mg^{2+} plus）など）。

VI. AAV ベクター作製のアウトライン

1. pAAV-U6-ZsGreen1 Vector、pAAV-2xU6 Vector への合成オリゴ DNA のクローニング
   ↓
2. 1. でクローニングしたベクタープラスミド（pAAV Vector）の調製
   ↓
3. HEK293 細胞または HEK293T 細胞の播種
   ↓
4. pAAV Vector、pRC Vector および pHelper Vector の HEK293 細胞または HEK293T 細胞へのトランスフェクション
   ↓
5. 培地交換
   ↓
6. AAV ベクター産生細胞の回収（トランスフェクションから 2 ～ 3 日後）
   ↓
7. AAV ベクター産生細胞からのベクター抽出

VII. 実験操作

VII-1. In-Fusion HD Cloning Kit を用いた pAAV-U6-ZsGreen1 Vector、pAAV-2xU6 Vector への合成オリゴ DNA のクローニング

pAAV-U6-ZsGreen1 Vector の場合

（1）二本鎖オリゴ DNA の調製

1. 合成した相補オリゴ DNA（Top strand および Bottom strand）を終濃度 20 pmol/μl になるように二本鎖オリゴ DNA 調製用バッファーで希釈する。
2. サーマルサイクラーなどを用いて 95℃、5 分間加熱処理をし、30 分以上かけて 25℃まで徐冷する。

（2）ベクターを制限酵素で切断する。
pAAV-U6-ZsGreen1 Vector を *Xba* I および *Spe* I で切断し、アガロースゲル電気泳動で Stuffer sequence（約 900 bp）が切り出された断片（約 6 kb）を回収し、精製する。

（3）In-Fusion HD Cloning Kit を用い、下記の反応液を調製し、In-Fusion 反応を行う。

5 × In-Fusion HD Enzyme Premix	2 μl
精製 DNA ベクター	50 ～ 100 ng
二本鎖オリゴ DNA	3 pmol
dH_2O	X μl
Total	10 μl

50℃で 15 分間反応後、氷上に移す。

※詳細は In-Fusion HD Cloning Kit の取扱説明書をご確認ください。

（4）反応液を用いて、トランスフォーメーションを行う。この際に用いるコンピテントセルには、相同性組換えの起こりにくい *E. coli* HST08 Premium Competent Cells（製品コード 9128）の使用を推奨する。

pAAV-2xU6 Vector の場合

pAAV-2xU6 Vector は、クローニングサイトが 2 か所あるので、まず片方のサイトに pAAV-U6-ZsGreen1 Vector の場合と同様に二本鎖オリゴ DNA をクローニングした後、プラスミドを精製し、そのプラスミドを用いてもう片方のサイトに別の二本鎖オリゴ DNA をクローニングする。
なお、pAAV-2xU6 Vector を *Xba* I と *Spe* I で切り出した断片は約 4.5 kb 、*Sal* I と *Xho* I で切り出した断片は、約 4.9 kb になる。

VII-2. クローニングしたベクタープラスミドの調製

VII-1. でクローニングした目的配列を含むプラスミドを、細胞へのトランスフェクションに適したグレードでプラスミド DNA 調製を行う。DNA 濃度は 1 μg/μl に調整する。

（参考） NucleoBond Xtra Midi/Maxi（製品コード 740410.10/740414.10 など）の使用を推奨します。なお、同キットを用いた場合でも、トランスフェクションによる細胞毒性を軽減するために、取得したプラスミド DNA を 13,500 × *g* で 5 分間遠心し、その上清をプラスミド DNA 溶液として使用してください。

VII-3. HEK293 細胞または HEK293T 細胞の播種

HEK293 細胞または HEK293T 細胞を 100 mm φ細胞培養用表面処理ディッシュに 2.5 ～ 4.0 × 10^6 cells/dish で播種し、培養する。培地には 10% FBS 含有 DMEM 培地を使用する。
なお、以下 VII-4. で CalPhos Mammalian Transfection Kit もしくは Xfect Transfection Reagent を使用する場合は、培地量を 10 ml とし、*Trans*IT-293 Transfection Reagent を使用する場合は培地量を 15 ml としてください。

VII-4. pAAV Vector、pRC Vector および pHelper Vector の HEK293 細胞または HEK293T 細胞へのトランスフェクション

細胞播種翌日、VII-2. で精製した pAAV Vector、本キット添付の pRC Vector および pHelper Vector を用いて、VII-3. で播種した細胞へのトランスフェクションを行う。

トランスフェクション試薬は以下の 3 種類を推奨します。

a. CalPhos Mammalian Transfection Kit（製品コード 631312）
b. *Trans*IT-293 Transfection Reagent（製品コード MIR2704）
c. Xfect Transfection Reagent（製品コード 631317）

a は比較的安価にトランスフェクションを行うことができ、b は安定して高力価の AAV ベクターを取得するのに適しています。
以下、それぞれの試薬を使用した場合のトランスフェクションプロトコールを紹介します。

a. CalPhos Mammalian Transfection Kit を使用する場合

より高力価な AAV ベクターを取得するため、以下のプロトコールは CalPhos Mammalian Transfection Kit に添付のプロトコールを、本キットへの使用に合わせて一部改良しています。

1. 2 × HEPES-Buffered Saline を室温に戻しておく。
2. 2 M Calcium Solution を添付の Sterile H_2O 注射用水で 6 倍希釈し、333 mM Calcium Solution を調製し、室温へ戻す。
3. 以下の混合比でプラスミド DNA とカルシウム溶液を混合する。

pAAV Vector	1 μg/μl	6 μl
pRC Vector	1 μg/μl	6 μl
pHelper Vector	1 μg/μl	6 μl
Calcium Solution	333 mM	1,000 μl
Total		1,018 μl

4. 2 × HEPES-Buffered Saline が室温に戻っていることを確認し、3. に 3. の総量と等量の 2 × HEPES-Buffered Saline を添加し、チューブにフタをして上下に 15 回激しく振って混和する。
5. 3 分間静置する。

   注：静置時間は 3 分間を厳守し、3 分経過後は速やかに次の工程に進んでください。静置時間が長くなるとリン酸カルシウム -DNA の結晶が大きくなりすぎて、トランスフェクション効率が低下することがあります。

6. 前日に播種した HEK293 または HEK293T 細胞に 5. の混合液を滴下し、さらに培養する。

b. *Trans*IT-293 Transfection Reagent を使用する場合

1. *Trans*IT-293 Transfection Reagent を室温に戻し、使用前にボルテックスで混合する。
2. 以下の混合比で無血清の DMEM とプラスミド DNA を混合し、穏やかにピペッティングして完全に混合する。

pAAV Vector	1 μg/μl	5 μl
pRC Vector	1 μg/μl	5 μl
pHelper Vector	1 μg/μl	5 μl
無血清 DMEM もしくは Opti-MEM		1,500 μl
Total		1,515 μl

3. 2. に 45 μl の *Trans*IT-293 Transfection Reagent を添加し、穏やかにピペッティングして混合し、15 ～ 30 分間、室温で静置する。
4. 前日に播種した HEK293 または HEK293T 細胞に 3. の混合液を滴下し、さらに培養する。

c. Xfect Transfection Reagent を使用する場合

1. Xfect Polymer をボルテックスして混合する。
2. 以下の混合比で Xfect Reaction Buffer とプラスミド DNA を混合し、ボルテックスで 5 秒間激しく混合する。

pAAV Vector	1 μg/μl	13 μl
pRC2 Vector	1 μg/μl	13 μl
pHelper Vector	1 μg/μl	13 μl
Xfect Reaction Buffer		561 μl
Total		600 μl

3. 2. に 11.7 μl の Xfect Polymer を添加し、ボルテックスで 10 秒間激しく混合する。
4. 室温で 10 分間静置する。
5. 1 秒間溶液をスピンダウンし、前日に播種した HEK293 または HEK293T 細胞に滴下し、さらに培養する。

VII-5. 培地交換

トランスフェクションから 6 時間後～翌日に、新しい 2% FBS 含有 DMEM で培地を全量交換する。

注：CalPhos Mammalian Transfection Kit を使用してトランスフェクションを実施した場合は、顕微鏡観察により、リン酸カルシウムの結晶を確認することができます。

VII-6. AAV ベクター産生細胞の回収（トランスフェクションから 2 ～ 3 日後）

1. 0.5 M EDTA (pH8.0) を培養液の 1/80 容量で添加し、よく混合した後、10 分間室温で静置して、細胞をディッシュ表面から剥離させる。
2. 剥離させた細胞を遠心管に回収し、1,750 × *g* で 10 分間遠心後、上清を除いて細胞を回収する。

   注：上清が残っていると以降の工程に影響が出ることがあるため、完全に上清を除去できたことを確認してください。

VII-7. AAV ベクター産生細胞からのベクター抽出

AAV ベクター産生細胞からのベクター抽出には、キット添付の AAV Extraction Solution の使用を強く推奨します。本方法は添付のバッファーを使用するだけで簡便に AAV ベクターを抽出することができ、従来行われていた凍結融解法や超音波破砕法のように液体窒素や超音波破砕機を準備する必要がありません。また、本方法は従来の方法と比較して、高純度かつ簡便に AAV ベクターを抽出することができます（参考データ 2 参照）。

1. VII-6. で調製した細胞ペレットをボルテックスまたはタッピングで十分にほぐす。
   注：細胞ペレットが十分にほぐれていない場合、抽出効率が低下する恐れがあります。細胞の塊がないことを確認してから次の工程に進んでください。
2. 0.5 ml の AAV Extraction Solution A を添加する。
3. ボルテックスで 15 秒間懸濁する。
4. 室温で 5 分間静置後、さらに 15 秒間ボルテックスして懸濁する。
5. 2,000 ～ 14,000 × *g*、4℃で 10 分間遠心する。
6. 上清を新しいチューブに回収する。
7. 50 µl の AAV Extraction Solution B を添加してピペッティングにより混合する。

   注 1：回収した AAV ベクターの力価が低い場合は、上記 3. ～ 5. の工程を繰り返すことで抽出効率が向上することがあります。
   作製した AAV ベクターは− 80℃で保存することができます。

   注 2：サンプルによっては AAV Extraction Solution B を添加した際にピンク色に変わることがありますが、性能には問題ありません。

VIII. 参考 1：ウイルス力価の測定

ウイルス力価の測定法は、AAV ベクターゲノムをリアルタイム PCR で定量することによるベクターゲノム定量法と、力価測定用細胞への感染試験を行う生物学的力価測定法があります。前者は迅速で定量性のある力価測定法であり、後者は実際の細胞への感染試験を行うことから、より正確で実質的な力価測定法です。なお、その他の AAV ベクターの力価測定法として、ウイルス外殻タンパクを定量する方法もありますが、この方法では中空粒子を偽陽性として検出してしまう恐れがあります。

ベクターゲノム定量法による AAV ベクターの力価測定法

ベクターゲノム定量法によるウイルス力価の測定には AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2（製品コード 6233）を用いることができます。AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 はリアルタイム PCR により、ITR 領域をターゲットとしてベクターゲノムを定量することができるキットです。

蛍光タンパク質 ZsGreen1 遺伝子を搭載した AAV ベクターの生物学的力価測定法

生物学的力価の測定では導入した遺伝子発現を検出して、その力価を測定します。以下に蛍光タンパク質である ZsGreen1 遺伝子を搭載した AAV ベクター（pAAV-ZsGreen1 Vector（製品コード 6231）と AAVpro Helper Free System を用いて調製）の生物学的力価測定法を紹介します。

1. 10% FBS を含有する DMEM を用いて、任意の細胞を 2 ～ 4 × 10^4 cells/ml に調製する。
2. 細胞培養用表面処理 24 well plate に 0.5 ml/well で播種し培養する。
3. 培養翌日に、調製した AAV ベクターを 10% FBS を含む DMEM で段階希釈する。希釈倍率はウイルス力価にもよるが、1,000 ～ 100,000 倍での段階希釈が望ましい。
4. 感染から 2 ～ 3 日後、細胞を Trypsin/EDTA で剥がして回収し、フローサイトメーターに供して ZsGreen1 陽性率を評価する。

IX. 参考 2：ライゲーションによる合成オリゴ DNA のクローニング

ライゲーションによりヘアピン型 RNA を発現させるための合成オリゴ DNA をクローニングする場合は、［Ligation 用の制限酵素サイト－標的配列（センス）－ループ配列－標的配列（アンチセンス）－ターミネーター配列－ Ligation 用の制限酵素サイト］の順で合成 DNA をデザインします。pAAV-U6-ZsGreen1 ベクターのクローニングサイトは、上流側が *Xba* I、下流側が *Spe* I です。pAAV-2xU6 Vector ベクターのクローニングサイトは 2 か所あり、1 つは上流側が *Xba* I、下流側が *Spe* I、もう 1 つは上流側が *Sal* I、下流側が *Xho* I です。

挿入のために、下図に示すような合成オリゴ DNA を作製してください（Top strand と Bottom strand の 2 本；N 部分が標的配列）。pol III 系プロモーターの転写開始点はプリン塩基（G または A）が好ましいため、標的配列が G または A で始まらない場合は標的配列の前に G または A を挿入してください。

ここではループ配列の例として CTGTGAAGCCACAGATGGG（Boden *et al.*[7]）を挙げていますが、GTGTGCTGTCC（Miyagishi *et al.*[8]）も有用であることが確認されています。これ以外のヘアピンループとして、Lee *et al.*[9]、Paddison *et al.*[10]、Paul *et al.*[11]、Sui *et al.*[12] らによってそれぞれ異なった配列が報告されています。1 つのベクターに 2 つの shRNA 発現ユニットを搭載する場合には、ベクター内での組換えのリスクを軽減する目的で 2 つの shRNA に別々のループを使用することを推奨します。

ターミネーター配列には TTTTTT 配列を用います（T が 4 つ続くと pol III 系プロモーターによる転写が止まります）。siRNA 配列と用いるヘアピンループ配列の組み合わせによっては T が 4 つ以上続く可能性があるため、合成 DNA をデザインした後には必ず、Top strand に T が 4 つ以上続いていないことを確認することが必要です。

＜ *Xba* I- 標的配列（センス）－ループ配列－標的配列（アンチセンス）－ターミネーター配列 -*Spe* I ＞

		転写開始点＊				
	Xba I	↓ target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator	*Spe* I
Top	5'-pCTAGA(G/A)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	(C/T)TTTTTT	A-3'
Bottom	3'-T(C/T)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	(G/A)AAAAAA	TGATCp-5'

＜ *Sal* I- 標的配列（センス）－ループ配列－標的配列（アンチセンス）－ターミネーター配列 -*Xho* I ＞

		転写開始点＊				
	Sal I	↓ target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator	*Xho* I
Top	5'-pTCGAC(G/A)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	(C/T)TTTTTT	C-3'
Bottom	3'-G(C/T)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	(G/A)AAAAAA	GAGCTp-5'

＊：ターゲット配列の最初の塩基が G または A でない場合はターゲット配列の前に G または A を挿入すること。

【注意】ライゲーションにより合成オリゴ DNA をクローニングする場合は、合成するオリゴ DNA の 5' 末端をリン酸化修飾してください。
また、制限酵素処理したベクターは脱リン酸化処理を行ってください。
なお、ライゲーションによるクローニングの場合、複数のオリゴ DNA が挿入される場合がありますのでご注意ください。

X. 参考データ 1：pRC2-mi342 Vector 使用による AAV2 ベクタータイター向上効果

血清型 2 の AAVpro Helper Free System に含まれる pRC2-mi342 Vector を使用することで、より高力価な AAV2 ベクターを作製することができます。
以下に参考データとして、pRC2-mi342 Vector を使用することによる AAV2 ベクターの力価向上効果を示します。

実験方法

HEK293 細胞に下記プラスミドをトランスフェクションして AAV2 ベクターを取得した。AAV2 ベクター作製条件は下記のとおりである。

トランスフェクション法：リン酸カルシウム法
トランスフェクションに使用したプラスミド：
- pAAV-CMV-AcGFP1 Vector
- pRC2-mi342 Vector または pRC2 Vector＊
- pHelper Vector

培養容器：T25 フラスコ

＊：pRC2 Vector：pRC-mi342 Vector から hsa-miR-342 発現カセットを除いた Vector

得られた AAV2 ベクターの力価をリアルタイム PCR により評価した。
その結果を図 9 に示す。hsa-miR-342 を発現する pRC2-mi342 Vector を使用することにより、pRC2 Vector と比較して約 2 倍高い力価の AAV2 ベクターが得られた。

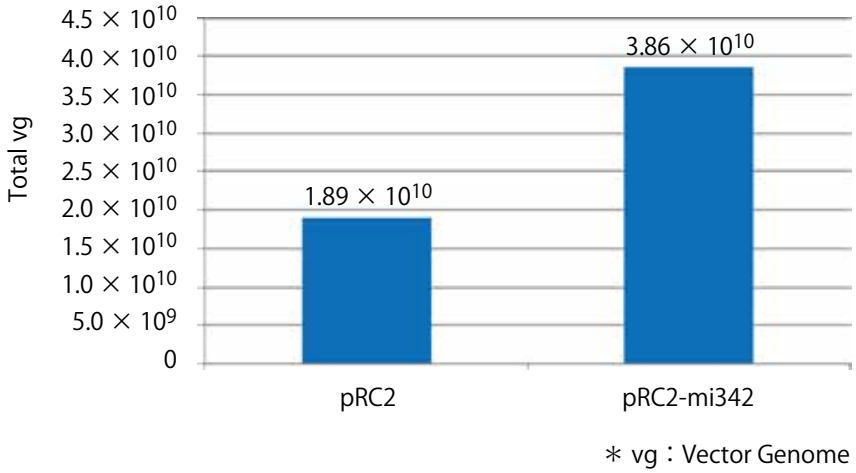


図 9. AAV2 ベクター作製における pRC2-mi342 の効果

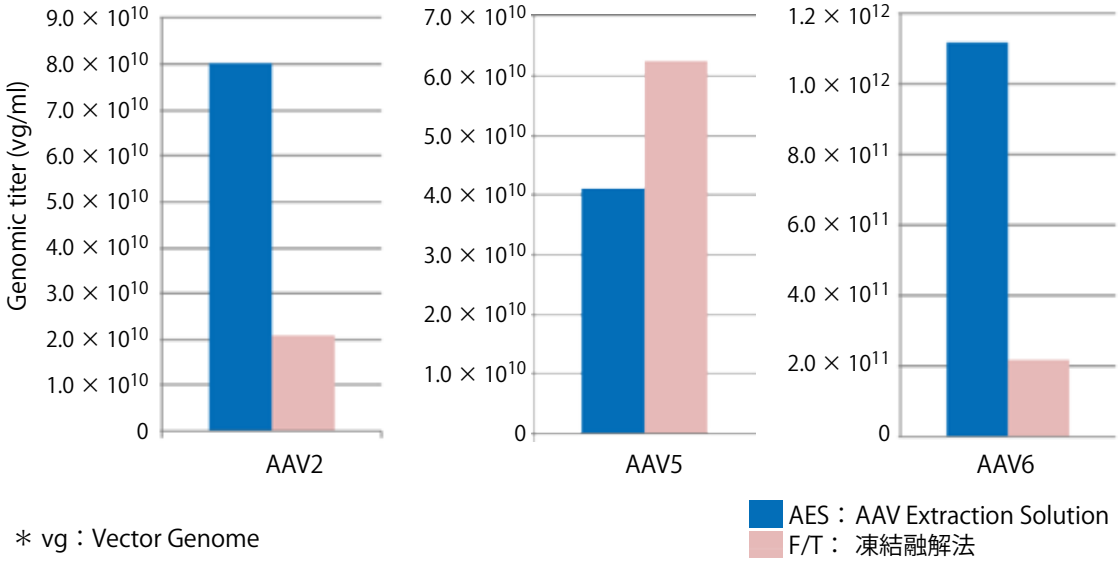
XI. 参考データ 2：AAV Extraction Solution による AAV ベクター抽出効果

本製品に含まれる AAV Extraction Solution A および B を使用することで、簡便に効率よく AAV ベクターを抽出することができます。なお、これらの溶液セットは AAVpro Extraction Solution（製品コード 6235）としてご購入いただけます。以下に参考データを示します。

XI-1. 凍結融解法との比較実験 1

本製品を用いて ZsGreen1 を搭載した各血清型の AAV ベクターを産生する HEK293 細胞を作製した。得られた細胞から AAV Extraction Solution を使用して AAV ベクターの抽出を行った。比較対照として、凍結融解法により AAV ベクターを抽出した。得られた抽出液はリアルタイム PCR によるベクターゲノム定量および HT1080 細胞への感染試験を行い、その力価を評価した（図 10A、B）。その結果、本製品を用いることで簡便に AAV ベクターを得ることができ＊、抽出した AAV ベクターは、感染性を有することが示された。

＊：血清型によっては、凍結融解法と比較して抽出効率が低下することもあります。



＊ vg：Vector Genome

図 10A. AAV Extraction Solution を用いた AAV 抽出効率 – ベクターゲノム定量 –

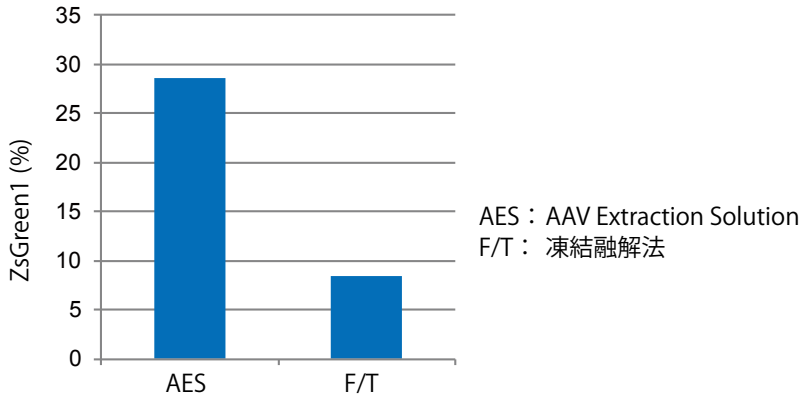


図 10B. AAV Extraction Solution を用いた AAV2 抽出効率 –HT1080 への感染力価–

XI-2. 凍結融解法との比較実験 2

本製品を用いて各血清型の AAV ベクターを産生する HEK293 細胞を作製した。得られた細胞から AAV Extraction Solution を使用して AAV ベクターの抽出を行った。比較対照として、凍結融解法により AAV ベクターを抽出した。得られたウイルス液はリアルタイム PCR によるベクターゲノム定量を行った後、1 × 10^9 vg 分のウイルス液を SDS-PAGE に供して、ウイルス液中に混入している不純タンパク質を評価した（図 11）。さらに AAV2 ウイルス液中の 2 本鎖 DNA 量をインターカレーター法により定量し、混入している 2 本鎖 DNA の定量を行った（図 12）。
その結果、AAV Extraction Solution を使用して得られたウイルス液は、凍結融解法と比較して明らかに不純タンパク質と 2 本鎖 DNA の混入が少ないことが示された。

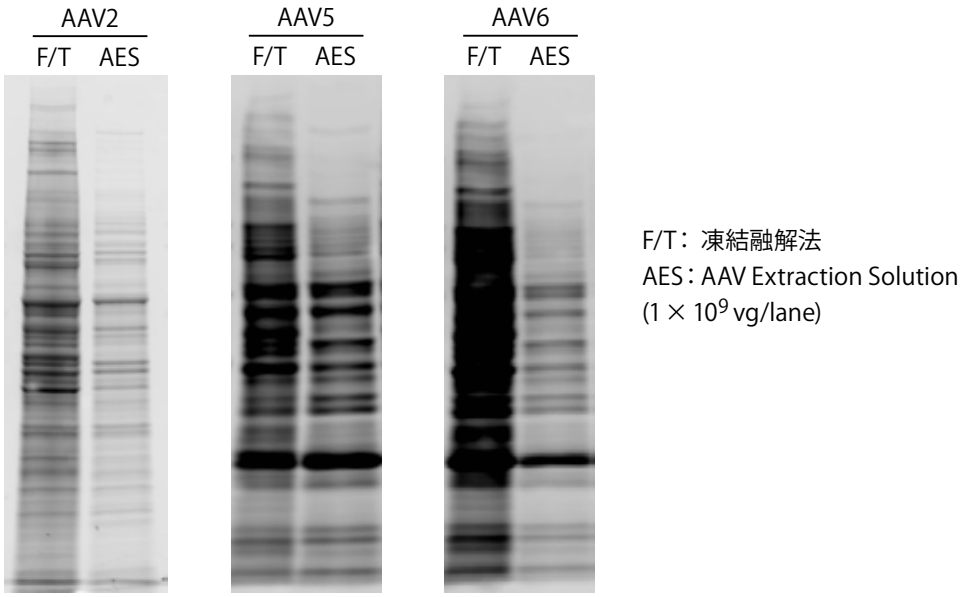


図 11. AAV Extraction Solution を用いて抽出した AAV 溶液の SDS-PAGE

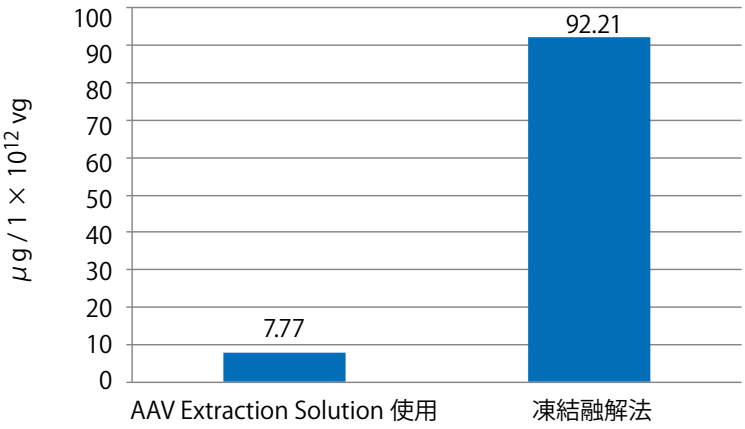
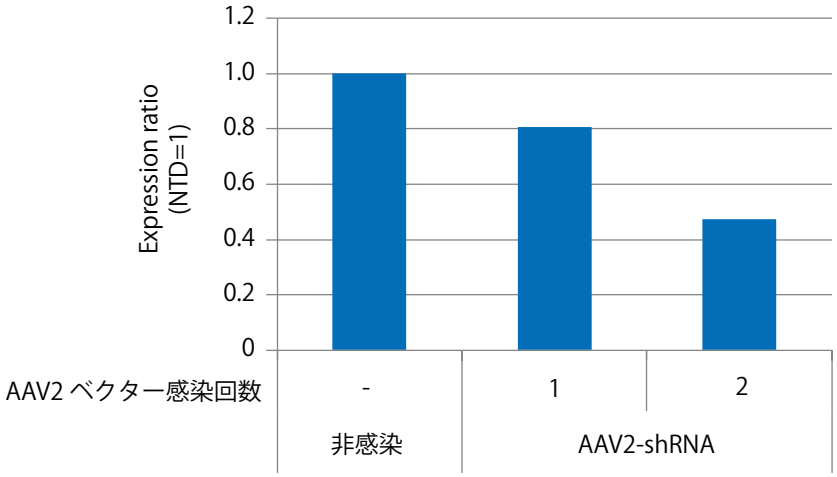


図 12. AAV Extraction Solution を用いて抽出した AAV2 溶液中の 2 本鎖 DNA 混入量

XII. 参考データ 3：shRNA 発現によるノックダウン効果の確認

蛍光タンパク質を安定的に発現する細胞にその蛍光タンパク質に対する shRNA を発現する AAV2 ベクター（pAAV-U6-ZsGreen1 使用）を感染させた結果、感染回数依存的にノックダウン効果が向上した。



XIII. 参考文献

1) Miyake K, *et al.* (2012) *J Nippon Med Sch.* **79**(6), 394-402.
2) Van Vliet KM, *et al.* (2008) *Methods Mol Biol.* **437**, 51-91.
3) Wu Z, *et al.* (2006) *Mol Ther.* **14**(3), 316-327.
4) 小澤敬也 *et al.* (2007) 蛋白質核酸酵素 **52**(10), 1288-1293.
5) Zincarelli C, *et al.* (2008) *Mol Ther.* **16**(6), 1073-1080.
6) Ellis BL, *et al.* (2013) *Virol J*. **10**, 74.
7) Boden *et al*. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, 1154-1158.
8) Miyagishi *et al.* (2004) *J Gene Med*. **6**, 715-723.
9) Lee *et al.* (2002) *Nat Biotech.* **20**, 500-505.
10) Paddison *et al.* (2002) *Genes and Dev.* **16**, 948-958.
11) Paul *et al.* (2002) *Nat Biotech.* **20**, 505-508.
12) Sui *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**, 5515-5520.

XIV. 関連製品

In-Fusion® HD Cloning Kit（製品コード 639648 など）
CalPhos™ Mammalian Transfection Kit（製品コード 631312）
*Trans*IT-293 Transfection Reagent（製品コード MIR2704/MIR2700/MIR2705/MIR2706）
Xfect™ Transfection Reagent（製品コード 631317/631318）
Lenti-X™ 293T Cell Line（製品コード 632180）
pAAV-ZsGreen1 Vector（製品コード 6231）
AAVpro® Purification Kit (AAV2)（製品コード 6232）
AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2（製品コード 6233）
AAVpro® Extraction Solution（製品コード 6235）
AAVpro® Helper Free System (AAV2)（製品コード 6230）
AAVpro® Helper Free System (AAV5)（製品コード 6650）
AAVpro® Helper Free System (AAV6)（製品コード 6651）
AAVpro® Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase)（製品コード 6652）
AAVpro® Helper Free System (AAV5-CRE Recombinase)（製品コード 6653）
AAVpro® Helper Free System (AAV6-CRE Recombinase)（製品コード 6654）
AAVpro® Helper Free System (AAV2-LacZ)（製品コード 6655）
AAVpro® Helper Free System (AAV5-LacZ)（製品コード 6656）
AAVpro® Helper Free System (AAV6-LacZ)（製品コード 6657）
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV2)（製品コード 6234）
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV5)（製品コード 6664）
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV6)（製品コード 6665）

XV. 使用上の注意

- 本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- AAVpro、*TaKaRa Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の、In-Fusion は Clontech Laboratories, Inc. の登録商標です。CalPhos、Xfect、Lenti-X は Clontech Laboratories, Inc. の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。
- 本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますので、ご了承の上ご使用ください。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999　Fax 077-565-6995
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/
タカラバイオ株式会社

v201508Da